

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-147534

(43)Date of publication of application : 02.06.1998

(51)Int.Cl.

A61K 35/60

A61K 35/60

A61K 35/84

A61K 45/00

(21)Application number : 08-324595

(71)Applicant : YAKIDA AKIKUNI
SEISHIN KIGYO:KK
NOF CORP

(22)Date of filing : 19.11.1996

(72)Inventor : YAKIDA AKIKUNI

(54) TUMOR NEWBORN BLOOD VESSEL INHIBITOR AND MEDICINE COMPOSITION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject inhibitor to be readily administered orally, capable of eliminating a taste and a smell, by embedding finely granulated gristle of shark in an oil and fat matrix and coating the surface of the oil and fat matrix with a specific lipid.

SOLUTION: Gristle of shark, preferably collected from *Prionace glauca* is finely granulated to give fine powder of gristle of shark comprising ≥ 99.5 wt.% powder having $32\mu\text{m}$ particle diameter. The fine powder is embedded in a matrix of oils and fats (e.g. hardened oil of beef tallow) having preferably $42-56^\circ\text{C}$ melting point. The surface of the oil and fat matrix is coated with other oils and fats having a melting point different from that of the oils and fats to give a tumor newborn blood vessel inhibitor. The inhibitor has both anti-cancer action and analgesic action. When the inhibitor is used as an anti-cancer medicine, a dose is preferably about 1-10g/day as an of the active ingredient to an adult by oral administration.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.09.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3103513

[Date of registration] 25.08.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] the inside of a fats-and-oils matrix — an impalpable powder-like shark — the neoplasm neovascularity inhibitor which is made to carry out embedding of the cartilage and is characterized by coming to coat said matrix front face further by other lipids in which the melting point differs from said fats and oils.

[Claim 2] an impalpable powder-like shark — the neoplasm neovascularity inhibitor which consists of a cartilage — it is — the shark of the shape of said impalpable powder — the neoplasm neovascularity inhibitor whose cartilage is that to which a thing with a particle size of 32 micrometers or less occupies 99.5 % of the weight or more.

[Claim 3] a shark — the neoplasm neovascularity inhibitor according to claim 1 or 2 whose cartilage is what uses a great blue shark as a raw material.

[Claim 4] The physic constituent characterized by using neoplasm neovascularity inhibitor according to claim 1, 2, or 3 as a principal component.

[Claim 5] The anticancer agent characterized by using neoplasm neovascularity inhibitor according to claim 1, 2, or 3 as a principal component.

[Claim 6] The cancer treatment approach characterized by sufficient thing to do for amount administration to check neoplasm neovascularity for neoplasm neovascularity inhibitor according to claim 1, 2, or 3.

[Claim 7] The physic constituent characterized by containing neoplasm neovascularity inhibitor and interleukin 12 inductor.

[Claim 8] The anticancer agent characterized by containing neoplasm neovascularity inhibitor and interleukin 12 inductor.

[Claim 9] The cancer treatment approach characterized by using together neoplasm neovascularity inhibitor and interleukin 12 inductor.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to neoplasm neovascularity inhibitor excellent in the anticancer operation and the analgesic action, the physic constituent containing this, and the cancer treatment approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] A shark (shark) is a fish belonging to Chondrichthyes, and inhabits the land part suburbs. the shark which the frame of a shark is a cartilage, and captures and slaughters a shark, and acquires and ** the cartilage — a cartilage has neoplasm depressor effect and that it is effective in cancer treatment gets to know it — having — *** — for example, the product from the U.S. — a shark — the car tee RAID which is a cartilage product is marketed as an antitumor agent.

[0003] A neoplasm is 3 1-2mm. If it becomes the magnitude of extent, the neovascularity promoting agent will be produced and it will come to supply own nutrition and oxygen of a neoplasm required for growth. although controlling growth of this neovascularity controls hypertrophy of a tumor cell and various researches on the inhibitory action matter of neovascularity are done from the place effective in cancer treatment — a shark — it turns out that a cartilage has the operation which checks this neovascularity.

[0004] however, a shark — the effective dose for the neovascularity inhibition was very as abundant as per [50-60g] day, the taste and the smell of the cartilage were unpleasant and it was difficult to administer orally in many cases. a shark — a cartilage is the mixture of a mucopolysaccharide, does not have a medication method suitable besides being based on internal use, and needed to have the property dissolved in the intestines which are absorption parts within the stomach which is strong acid nature at the time of internal use, without dissolving. moreover — since debility is intense and many of cancer patients are difficult to administer orally in many cases, if such a taste, a smell, and the problem of a dose are not solved — a shark — it was in the situation which cannot apply a cartilage as an effective and high anticancer agent of versatility. then, a shark — utilizing a cartilage as effective neoplasm neovascularity inhibitor was called for strongly.

[0005] By the way, although interleukin 12 (IL-12) is discovered at first as one of the cytokine which has an activity operation of a spontaneous killer cell It becomes clear that it has the multiplication of a T cell (killer T cell) and the activity operation which have specific cell damage activity to a tumor cell by subsequent research. Further Having the production potentiation of the interferon gamma (IFNgamma) which has the operation to which activation of a killer T cell is urged comes to be admitted, and it is observed by a Homo sapiens cancer patient's therapy as useful matter.

[0006] About IL-12, it succeeded in being produced in large quantities by genetic manipulation in the U.S. recently (recon BINANTO IL-12 (rt-IL -12)). Then, the approach of introducing this interleukin 12 production gene into a cancer cell directly by the transgenics technique is also tried in order to medicate a cancer cell with IL-12 directly.

[0007] In order to utilize IL-12 and to aim at growth loss or disappearance of a neoplasm, the method of making IL-12 of self guide is in the living body besides [which prescribes IL-12 for the patient from the outside] an approach. Such self-IL-12 also had an advantage, like there is no possibility that an unusual immunoreaction may arise, and since susceptibility was high, they were that from which great neoplasm loss quenching is expected.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] the above-mentioned present condition — taking an example — this invention — the shark as neoplasm neovascularity inhibitor — it aims at offering the physic constituent which can prescribe a cartilage for the patient effectively as an anticancer agent. The purpose of this invention is to use together still such neoplasm neovascularity inhibitor and IL-12 inductor, and also offer a very useful anticancer agent.

[0009]

[Means for Solving the Problem] this invention — the inside of a fats-and-oils matrix — an impalpable powder-like shark — it is neoplasm neovascularity inhibitor which is made to carry out embedding of the cartilage and is characterized by said fats and oils coming to coat said matrix front face further by other lipids from which the melting point differs. This invention is explained in full detail below.

[0010] the shark which is the principal component of the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention — a cartilage is indispensable at the shape of impalpable powder. In this specification, the shape of impalpable powder means that the particle size is 1-90 micrometers. the shape of such impalpable powder — a shark — in order to obtain a cartilage — for example, a commercial shark — it is desirable to impalpable-powder-ize a cartilage. the

above-mentioned impalpable-powder-izing — a shark — if the protein which is an active principle in a cartilage exceeds 60 degrees C, since thermal denaturation will be carried out and effect will be lost, it is required to carry out to the bottom of low temperature. impalpable-powder-izing under the above-mentioned low temperature — for example, a shark — after freezing a cartilage at the moment by -196-degree C liquid nitrogen, coarse grinding can be carried out using cutter type grinders, such as ORIENT Mill, next high-speed rotor mold grinders, such as impeller RUMIRU, can grind with a frozen condition, and it can carry out by applying to air-current type grinders, such as a jet mill, further.

[0011] if in charge of preparation of the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention — the inside of a fats-and-oils matrix — the shape of above-mentioned impalpable powder — a shark — embedding of the cartilage is carried out. as fats and oils which constitute the above-mentioned fats-and-oils matrix, especially if usually used as an object for physic, it will limit — not having — for example, animal hardened-oil [such as vegetable hardened-oil; beef tallow, such as soybean oil rapeseed oil, palm oil, corn oil, and cotton seed oil, lard, and fish oil,]; — it can choose from from suitably among such mixture etc. Especially, the fats and oils whose melting point is 42-56 degrees C are desirable. Moreover, anti-oxidants, such as vitamin E and a catechin, may be used together depending on the case.

[0012] the impalpable powder shark of the above — the shape of the above-mentioned fats and oils in which it is not limited especially as the approach of carrying out embedding of the cartilage, using the above-mentioned fats and oils as a matrix, for example, was made to dissolve, and impalpable powder — a shark — embedding can be carried out by making it corn in the high-speed stirring granulation inside of a plane, mixing a cartilage.

[0013] the shape of impalpable powder manufactured as mentioned above — a shark — a cartilage embedding fats-and-oils matrix — next, the above-mentioned fats and oils are other lipids from which the melting point differs, and the front face is coated further. What is necessary is just to choose that in which the melting point differs from the fats and oils used as lipids of this invention in order to produce a fats-and-oils matrix previously, and what has the usually high melting point. Specifically, higher alcohol, such as fatty acids, such as waxes, such as a cull navarho, a rice wax, and yellow bees wax, animals-and-plants hardened oil, stearin acid, and a palmitic acid, natural resin like a shellac, palmityl alcohol, and stearyl alcohol, can be mentioned. Moreover, in the above-mentioned coating, approaches, such as a powder coating method, can be used, for example.

[0014] if it hits preparing the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention — the inside of others, for example, the fats and oils which carried out melting beforehand, — the shape of above-mentioned impalpable powder — a shark — after distributing a cartilage and carrying out spray cooling, the approach of coating the thing of the shape of impalpable powder of other lipids in which the melting point differs from the above-mentioned fats and oils within tumbling granulator etc. is also employable. [above]

[0015] the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention prepared as mentioned above — a shark — a cartilage can be used as a principal component and, moreover, the difficulty in internal use can be completely wiped away by masking the taste and a smell completely. Moreover, when friction in the front face of the prepared neoplasm neovascularity inhibitor decreases, the fluidity is improving, adhesion force can decline and it can consider as the very suitable pharmaceutical preparation for internal use. Furthermore, in the strong acid nature situation in the stomach, it does not dissolve but can dissolve in the intestines which are absorption parts.

[0016] the shape of impalpable powder of this invention — a shark — as for a cartilage, a thing with a particle size of 32 micrometers or less occupies 99.5 % of the weight or more. it explains in full detail in the example behind — as — the shape of impalpable powder of this invention — a shark — the particle size of a cartilage has very big effect in the effectiveness, and if particle size is too large, neoplasm neovascularity inhibitory action will fall. a shark — as the approach of arranging the particle size of a cartilage — the shape of impalpable powder — a shark — the approach of making the sieve of a desired mesh passing a cartilage etc. can be mentioned.

[0017] the shark used for this invention — the shark acquired [especially] from a great blue shark although the class of shark used as the raw material of a cartilage is not limited — a cartilage is desirable. the shark acquired from a great blue shark — a cartilage has many the protein and the mucopolysaccharides which are the contained active principle, especially they are good. In addition, since the car tee RAID from the U.S. is mixed as a raw material and manufactures the shark of varieties, variation is looked at by the product with a lot and it has become a fault that the effectiveness is also low.

[0018] The neoplasm neovascularity inhibitor of this invention not only has neoplasm neovascularity inhibitory action, but it turns out that it has a positive analgesic action. Especially in the case of terminal cancer, usually, a cancer patient is accompanied by the intense pain. Therefore, when the cancer patient who has a pain is medicated with the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention as an anticancer agent, the anticancer operation and analgesic action can express the synergistic effect, and can acquire a very effective curative effect.

[0019] When the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention examines how the neoplasm neovascularity inhibition effectiveness is discovered, it is suggested that it is what is depended on apoptosis so that it may explain in full detail in the following examples.

[0020] Although the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention is very useful as an anticancer agent, since it is utilizable as other physic applications from having the analgesic effect, the physic constituent containing the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention is also one of this inventions. Furthermore, the method of performing an anticancer therapy is also included in the range of this invention by prescribing for the patient only the amount which can discover the neoplasm neovascularity inhibition effectiveness for the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention.

[0021] The physic constituent of this invention is characterized by containing neoplasm neovascularity inhibitor and interleukin 12 inductor. The above-mentioned physic constituent constitutes the second this invention. Below, the second this invention is explained in full detail.

[0022] In this specification, the word of "interleukin 12 inductor" does not mean only the matter which can only guide interleukin 12 (IL-12) in the living body, you may be IL-12 themselves, may be an IL-12 transgenics cancer cell, and may be rt-IL -12, and in short, especially if IL-12 arise in the living body, it will not be limited. As such a thing, for example, an activation hemicellulose (Active Hemi Cellulose Compound (AHCC)) etc. can be mentioned. As a physiological active substance which carried out enzyme processing of the vegetable fiber contained in the cell wall of the hypha of a mushroom, AHCC is the well-known matter and already contains hetero glucan, such as alpha-(1->4) D-glucan besides beta-(1->3) D-glucan and beta-(1->6) D-glucan, peptide glucan, proteoglucan, lectin, a nucleic acid, an indigestible nature polysaccharide, etc.

[0023] IL-12 inductor of this invention can mention a mushroom mycelium component besides Above AHCC etc. PSK which is the mycelium component of the shelf fungus which is not limited especially as the above-mentioned mushroom mycelium component, for example, is used as a well-known anticancer agent, SPG which is the mycelium component of Schizophyllum commune Fries, the lentinan which is the mycelium component of shiitake mushroom can be mentioned. Moreover, as such a mushroom mycelium component, mushroom mycelium components, such as AGARISUKU, Ganoderma, NINGYOTAKE, an Agaricus blazei Murill, a NIOU Shimeji mushroom, wall NOR NATAKE, maitake mushrooms, Hericium erinaceum, an oyster mushroom, MANNENTAKE, MUKITAKE, a cob bamboo, KAIGARATAKE, matsutake, an oyster mushroom, a tortoiseshell bamboo, an enoki, and an enoki mushroom, can be mentioned further.

[0024] As IL-12 inductor of this invention, the fungus body component of hemolytic streptococcus etc. can be mentioned further. It is not limited especially as a fungus body component of such hemolytic streptococcus, for example, the well-known anticancer agent of O.K.-432 grade etc. can be mentioned. These are already well-known matter as a biological activator (Biological response modifier (BRM)).

[0025] The IL-12 above-mentioned inductor has the operation to which activation of a killer T cell is urged. Therefore, a killer T cell in the living body is activated with the IL-12 above-mentioned inductor. On the other hand, the neoplasm neovascularity inhibitor explained in full detail upwards controls growth of the neovascularity of a cancer cell (tumor cell). The tumor cell which had growth of neovascularity controlled discovers the adhesion factor of a Fas antigen, CD80, and CD86 grade on a neoplasm front face by the stress by the ischemia. Since the killer T cell has the capacity which carries out antigen recognition of the adhesion factor of such a Fas antigen, CD80, and CD86 grade, these discovered adhesion factor will be in the condition of it being easily recognized by the killer T cell, and getting. And the tumor cell which changed so that it might be recognized easily in this way will become [a killer T cell] is easy to be attacked easily. In such a condition, if the IL-12 above-mentioned inductor exists, as compared with being based on an operation of only IL-12 inductor, it will become easy to attack a tumor cell exceptionally notably. The synergistic effect of the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention and IL-12 inductor will be performed according to the above-mentioned mechanism, and a powerful anticancer operation will be discovered with that, and apoptosis will happen, and a tumor cell will be destroyed. This will not be found out without this invention person.

[0026] It is applicable suitably as a pharmaceutical form which it is not limited especially as a gestalt in the case of medicating Homo sapiens or an animal with the physic constituent of this invention, for example, support is made to support, and is used for various drugs. As such support, a solid, a half-solid or liquefied diluent, a bulking agent, and more than an assistant kind for other formulas are preferably used at 0.5 - 90% of a rate 0.1% to 99.5%, for example. Insurance can be medicated with this invention physic constituent taking-orally-wise or parenterally. as a parenteral administration gestalt — for example, partial administration of in-house administration etc., hypodermic administration, and intramuscular administration — it ** and administers intravenously, and it passes and rectum administration etc. is mentioned. What is necessary is just to prepare the pharmaceutical preparation mold which fitted these medication methods using the technical means of common knowledge common use.

[0027] For example, although it is desirable to set up after taking into consideration a class, extent, etc. of a patient's age, weight, a route of administration, and the illness as for the dose as an anticancer agent, in administration to Homo sapiens, it is usually common to prescribe 1-10g /for the patient in a day in 5-6g /preferably a day in taking orally as an amount of active principles to an adult. Moreover, what is necessary is just to usually prescribe 100-10000mg /for the patient in the 2-5g [/day] range preferably a day parenterally, although it changes greatly with routes of administration. Depending on the case, less than [this] is enough and the dosage beyond this may be needed conversely. Moreover, it can divide into 2 - 4 times per day, and a medicine can also be prescribed for the patient.

[0028] The pharmaceutical form of a solid or liquefied dosage unit, for example, an end agent, powder, a granule, a tablet, a capsule, syrups, elixirs or suspension, and others can perform internal use.

[0029] An end agent is manufactured by making an active substance into suitable fineness. Powder is manufactured by mixing with the support for physic which made the active substance suitable fineness and subsequently made it fine similarly, for example, starch, and an edible carbohydrate and other excipients like a mannitol. The thing of a taste correcting agent, a preservative, a dispersant, a coloring agent, perfume, and others may be blended if needed.

[0030] A capsule is manufactured by being filled up with what granulated an agent, powder, or a tablet after making it the shape of powder as mentioned above first into a capsule envelope like a gelatine capsule. Moreover, lubricant,

BEST AVAILABLE COPY

a plasticizer, for example, the silica or colloid, talc, magnesium stearate, calcium stearate, a solid polyethylene glycol, etc. may be mixed to arbitration before restoration. If disintegrator, a solubilizing agent, for example, a carboxymethyl cellulose, carboxymethyl-cellulose calcium, hydroxypropylcellulose, cross carmellose sodium, carboxy starch sodium, a calcium carbonate, a sodium carbonate, etc. are added, medicinal effectiveness when a capsule is taken in is improvable.

[0031] Moreover, suspension distribution of the impalpable powder of this article is carried out into vegetable oil, a polyethylene glycol, a glycerol, and a surface active agent, and this can be wrapped in a gelatin sheet and it can consider as an elastic capsule.

[0032] A granule adds and kneads binders (for example, carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylcellulose, methyl cellulose, the hydroxypropyl methylcellulose, gelatin, a polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol, etc.) and wetting agents (for example, syrup, starch paste, gum arabic, a cellulose solution, or a high polymer solution etc.) if needed to what mixed an above-mentioned excipient and disintegrator with the active substance made into the shape of powder, subsequently, can carry out forcible passage and can prepare a screen. Thus, after applying to a tableting machine first instead of granulating powder, the slag of the imperfect gestalt acquired can be crushed and it can also be made granulation. Dissolution delay-ized agents (for example, paraffin, a wax, hydrogenated castor oil, etc.), resorption agents (for example, the fourth class salt etc.), or adsorbents (for example, a bentonite, a kaolin, phosphoric-acid JIKARUSHIUMU, etc.) may be mixed beforehand.

[0033] A tablet can be prepared by adding and tableting stearin acid, a stearate, talc, and a mineral oil and others as lubricant to the granule made by doing in this way. In this way, film coating and glycocalyx may be further given to the manufactured uncoated tablet.

[0034] Without passing through the process of granulation or slagging as mentioned above, after mixing with a fluid inert carrier, you may tablet the active ingredient of this invention directly. The transparence which consists of a sealing coat of a shellac or translucent protective covering, covering of sugar or polymeric materials, covering on ** that consists of a wax can be used.

[0035] The constant rate can make other internal use pharmaceutical forms, for example, syrups, elixirs, suspension, etc. dosage unit form voice so that the constant rate of a drug may be contained. Syrups dissolve an active substance in a suitable flavor water solution, and are manufactured, and elixirs are manufactured by using nontoxic alcoholic support. Suspension is prescribed by distributing an active substance in nontoxic support. A suspending agent, an emulsifier (for example, the isostearyl alcohol and polyoxyethylene sorbitol ester which were ethoxylated), a preservative, a taste correcting agent (for example, a PEPAMINTO oil, saccharin), and others can also be added to arbitration.

[0036] You may microencapsulate the dosage unit formula for internal use if needed. This formula can also bring about extension and self-sustaining emission of reaction time by covering again or embedding an active substance into a macromolecule, a wax, etc.

[0037] Hypodermically, intramuscular, or ** and intravenous administration can be performed by considering as the injections of liquefied dosage unit form voice, for example, the gestalt of a solution or suspension. These things dissolve or suspend the constant rate of an active substance in the nontoxic liquefied support which suits the purpose of injection, for example, aqueosity and an oily solvent, and are manufactured by subsequently sterilizing this solution or suspension. Moreover, for a vial, after that, a vial and its contents may be sterilized and the constant rate of powder or the freeze-dried active substance may be sealed. In this case, in order to dissolve or mix just before administration, a preliminary vial and support may be prepared. In order to make a parenteral solution into an isotonicity, a nontoxic salt and salting in liquid may be added, and a stabilizing agent, a preservative, a suspending agent, an emulsifier, etc. can also be further used together.

[0038] It can pass and a rectum administration pharmaceutical form can be prepared by kneading an active substance into the suppository base of hydrophobicity or a hydrophilic property, for example, a polyethylene glycol, cacao butter, high-class ester (for example, palmitic-acid millimeter still ester), and those mixture.

[0039]

[Example] Although the example of manufacture and example of this invention are hung up over below and this invention is explained to it in more detail, this inventions are not these things limited to seeing.

example 1 of manufacture a shark — the shape of fines whose mean particle diameter is 27 micrometers at the manufacture high-speed stirring granulating machine (high-speed mixer: Fukae industrial company make) of the fats-and-oils matrix covering pharmaceutical preparation of a cartilage — a shark — the fused beef tallow hardened-oil (melting point of 48 degrees C) 10 weight section was sprayed, having taught the cartilage 60 weight section, having kept temperature inside the plane at 10 degrees C, and applying stirring of 20 - 100rpm. melting fats and oils — the shape of fines — a shark, although the matrix was formed incorporating a cartilage this phase — a front face — a shark, since the cartilage is exposed and sufficient covering engine performance is not obtained Furthermore, the fines-like rapeseed hardened-oil (melting point of 68 degrees C) 30 weight section with a mean particle diameter of 5 micrometers is stirred for 30 minutes by about 1000 agitating speed rpm in the same agitator granulation inside of a plane as lipids from which the melting point differs on the front face of this primary matrix. The good fats-and-oils matrix covering pharmaceutical preparation which has acid resistance and sustained-release was prepared coordination and by carrying out spreading.

[0040] Example 1 Neoplasm neovascularity depressant action trial by the mouse (shark evaluation of cartilage particle size)

a DOSARU air sac (dorsal air sac) — it examined by law. A Millipore filter is stuck on both sides of the plastics ring

BEST AVAILABLE COPY

of 5mm of diameters, and it is 1×10^6 MH-134 tumor cell of an individual was poured in with culture medium, and the chamber was created. The mouse was divided into one groups [six] and this chamber was inserted in hypodermically [mouse regions-of-back]. the shark shown in the mouse of four groups for four days at the following — 1000 mg/kg internal use of the cartilage was carried out, and inhibition extent of neovascularity was evaluated on the 5th. another group — as control — a shark — it was made to pass without prescribing a cartilage for the patient at all, and inhibition extent was evaluated similarly on the 5th. Whenever the neovascularity promoting agent from a neoplasm penetrates a Millipore filter, neovascularity carries out hyperplasia to the field which touched the chamber, and is observed in it. The neovascularity of this neoplasm is presenting the shape of RASEN. Inhibition extent of the hyperplasia of this neovascularity was evaluated in accordance with the following valuation bases.

(++) three point: — (+) two whose hyperplasia of neovascularity is Tsuguaki point: — (**) 1 in which neovascularity is carrying out hyperplasia point: — (-) zero in which neovascularity is carrying out hyperplasia a little point: — it expressed with the percentage reduction [as opposed to / again / a control group in the rate of control] (%) of a score in which the hyperplasia of neovascularity is not accepted at all.

[0041] a shark — cartilage (1): — a shark — as the raw material of a cartilage — the product from the U.S. — a shark — using the car tee RAID which is a cartilage product, this thing was frozen at the moment by liquid nitrogen (-196 degrees C), and coarse grinding was carried out with the cutter type grinder (ORIENT Mill). Next, with the frozen condition, the high-speed rotor mold grinder (impeller RUMIRU) ground, and finally, with the air-current type grinder (jet mill), it ground further, acquired and adopted.

a shark — cartilage (2): — the above-mentioned shark — what did not pass having applied the cartilage (1) to the 32-micrometer sieve was adopted.

a shark — cartilage (3): — the above-mentioned shark — what passed having applied the cartilage (1) to the 32-micrometer sieve was adopted. The result was shown in Table 1.

[0042]

[Table 1]

	++ (3点)	+ (2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	4匹	2匹	0匹	0匹	2.7 ± 0.5	--
サメ軟骨(1)	2匹	3匹	1匹	0匹	2.2 ± 0.8	18.5
サメ軟骨(2)	2匹	4匹	0匹	0匹	2.3 ± 0.5	14.8
サメ軟骨(3)	1匹	4匹	1匹	0匹	2.0 ± 0.8	25.9*

* $P < 0.05$

[0043] the shark from the above result — a shark with the particle size of extent which passes a 32-micrometer sieve also among cartilages — it turned out that cartilage grinding powder has high neovascularity inhibitory action.

[0044] Example 2 Neoplasm neovascularity depressant action trial by the mouse (comparison with car tee RAID and better SHAKU)

an example 1 — the same — the DOSARU air sac method — using — the product from the U.S. — a shark — the shark of the car tee RAID which is a cartilage, and a great blue shark — comparison examination with a cartilage (better SHAKU) was carried out. The result was shown in Table 2. By car tee RAID, by the 100 mg/kg administration group, although the rate of control (fall [of the mark to a control group] %) was 3.6%, by the 1000 mg/kg administration group, the rate of control is 21.4% and the significant difference ($P < 0.05$) was accepted. On the other hand, in better SHAKU, the rate of control is 17.9% by the 100 mg/kg administration group, the significant difference ($P < 0.05$) was accepted, the rate of control indicated the highest value to be 35.7% by the 1000 mg/kg administration group, and the significant difference ($P < 0.002$) was accepted. Moreover, the significant difference was accepted also between car tee RAID and better SHAKU ($P < 0.05$).

[0045]

[Table 2]

	投与量 (mg/kg)	++ (3点)	+ (2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	--	9匹	1匹	0匹	0匹	2.8 ± 0.4	--
カーティレイド	1000	3匹	6匹	1匹	0匹	2.2 ± 0.8	21.4*
カーティレイド	100	6匹	4匹	0匹	0匹	2.7 ± 0.5	3.6
ベターシャーク	1000	3匹	2匹	5匹	0匹	1.8 ± 1.0	35.7**
ベターシャーク	100	5匹	4匹	1匹	0匹	2.3 ± 0.8	17.9*

* $P < 0.05$ ** $P < 0.002$

[0046] the shark from the above result — it turned out also among cartilages that better SHAKU has neoplasm neovascularity inhibition activity more higher than car tee RAID.

[0047] Example 3 Increment inhibition test in a neoplasm by the mouse (the amount measurement trial of

effectiveness manifestations of better SHAKU)

the 1x10⁶ individual of a tumor cell (Sarcoma-180) — an ICR mouse (a male —) The group which transplanted six-week ** to hypodermically [of three groups / regions-of-back] by one groups [ten], and administered car tee RAID (from the U.S.) orally for consecutive 1 one 20-day times per day by 1000 mg/kg from immediately after [the]. Better SHAKU (however, arrange particle size with 32 micrometers or less, and it sets to pH2) Even if put for 3 hours, the trial was presented with 3 of the group which prescribed the stable thing for the patient between tales-doses synchronizations, and the group bred for 20 days without prescribing anything for the patient groups, and it slaughtered after progress on the 25th, and neoplasm weight was measured. The result was shown in Table 3. The percentage reduction (%) of weight to a control group showed the rate of control. In the car tee RAID administration group, the significant difference (P<0.001) was accepted at 47.0% by the better SHAKU administration group to having been 11.1% of rate of control to the control group. Moreover, it turned out that the direction of better SHAKU has stronger antitumor action also as for the comparison with car tee RAID and better SHAKU (P<0.05).

[0048]

[Table 3]

	平均腫瘍重量 (g)	抑制率 (%)
コントロール	2.752 ± 1.388	—
カーティレイド	2.446 ± 1.139	11.1*
ベターシャーク	1.457 ± 1.965	47.0**

*P<0.05

**P<0.001

[0049] From the above result, when better SHAKU (particle size of 32 micrometers or less) was used, it was able to be imagined as what sufficient effectiveness will be accepted in also by 20 g/body in clinical for one day.

[0050] Example 4 Acetic-acid rye SHINGU (Writhing) examined the analgesic effect of analgesic effect trial better SHAKU by the mouse. The ICR mouse (a male, five-week **) was divided into five groups by one groups [ten], each group was medicated with each tested specimen as follows, intraperitoneal was medicated with the acetic acid 2% after progress on the 40th, and the count which the mouse turned round and caused reflection during the 10th — the 20th [after acetic-acid administration] was measured. The tested specimen continued administration until measurement finished after [administration] every day. For 1000 mg/kg internal use and a better SHAKU administration group, the Indacin administration group is [a car tee RAID administration group / 1000 mg/kg internal use and a better SHAKU administration group] Indacin (non-steroid system painkiller.) per day about better SHAKU per day in car tee RAID. It bred without 25 mg/kg internal use and a chondroitin sulfate administration group prescribing a commercial item for the patient and 333 mg/kg internal use and a control group prescribing any chondroitin sulfate (commercial item) for the patient per day per day. The rate of control was expressed with the count percentage reduction (%) to a control group. The result was shown in Table 4. The predominance of better SHAKU was shown also in the analgesic effect.

[0051]

[Table 4]

	振り返り反射回数	抑制率 (%)
コントロール	31.2 ± 9.6	—
カーティレイド	24.3 ± 3.9	23.6*
ベターシャーク	21.2 ± 10.4	32.1*
インダシン	10.3 ± 5.6	67.0**
コンドロイチン硫酸	23.4 ± 4.5	25.0*

*P<0.05

**P<0.001

[0052] Example 5 The manifestation Homo sapiens (a male, 80 years old) of the immunological unique antigen by the clinical example of better SHAKU pharmaceutical preparation administration appealed against epigastric region displeasure, and was diagnosed as there being gastric cancer (seal cell cancer) of an Ilc advance mold at least in the gastric angle upper part with gastroscopy. The biopsy specimen was used for the electron microscope and the organization biopsy (immunological examination). Since there was myocardial infarction, it was inoperableness. the shark used in the example 1 — it prescribed a cartilage (3) and (it having been hereafter called "beta SHAKU" in an example 5) for the patient 120g oral every day to the above-mentioned patient. [per day] The electron microscope view and the immunological special staining procedure view (gastroscopy of the 1st time) of the view which shows apoptosis only with the general view of the usual cancer cell before better SHAKU administration are very slight, the

BEST AVAILABLE COPY

adhesion factor (fluorescent antibody technique) of a Fas antigen (special staining procedure, was not accepted, either, and the manifestation of HSP60 (stress protein, heat shock protein fluorescent antibody technique) was not accepted, either. In the gastroscopy after half [two months and]-passing since the 1st endoscope, the circumference of cancer is the view which is apparently covered on normal membrane, and upheaval of surrounding cancer was also becoming flat. To a change special to a cell membrane and cytoplasm not being accepted, vena-contracta fission of the nucleus of a cancer cell becomes clear, and the electron microscope view in the biopsy of the 2nd time is apoptotic. body was accepted. That is, the electropositive view which shows apoptosis in a cancer cell was accepted.

[0053] The immunological special staining procedure was performed in the body tissue of this stage. anti-HSP60 antibody, anti-CD80 antibody, and anti-CD — the cancer cell was further examined 86 antibody using the anti-Fas antibody. The Fas antigen became a positivity by better SHAKU pharmaceutical preparation administration, and HSP60 and the adhesion factor of CD80 and CD86 became a positivity further. The cancer of the gastric angle upper part had disappeared completely with the gastroscopy of the 3rd time (from the 1st time to about five months after). In the biopsy of a part with gastric cancer, the cancer cell was all negative.

[0054] When the above view was summarized, the Fas antigen which is not accepted before better SHAKU pharmaceutical preparation administration, HSP60 antigen, and the adhesion factor of CD80 and CD86 all became a positivity by after [better SHAKU pharmaceutical preparation administration] 2 months, and half. Then, cancer had disappeared completely with the gastroscopy of the 3rd time. Since the blood flow of a neoplasm was checked by better SHAKU pharmaceutical preparation administration, stress protein (HSP60) was discovered, it was thought that the Fas antigen and the adhesion factor of CD80 and CD86 became a positivity, and, as for this phenomenon, it was proved that a neoplasm is carrying out perfect **** with the endoscope of the 3rd time after that.

[0055] Research of tumor immunology showed that there were two kinds, necrosis (****) and apoptosis, at the regression of a neoplasm. the phenomenon in which, as for necrosis, nonspecific immunity acts and a neoplasm disappears by factors, such as inflammation, — it is — a cell membrane and cytoplasm — the occasion — a tumor cell is destroyed in order of nuclear denaturation. In this necrosis, histologically, after neutrophil leucocyte, a macrophage, line fibrocyte, etc. permeate, mineralization and fibrosis take place and cancer disappears. Consequently, a trace remains in a part.

[0056] On the other hand, when a neoplasm disappears by apoptosis, inflammation has completely placed and changed to normal tissue, without accepting a trace, without happening. In this case, a killer T cell recognizes the Fas antigen of the front face of a tumor cell, and pastes up, and it turns out that apoptosis is guided to coincidence by the synergy of the adhesion factor of CD80 and/or CD86 grade. After nuclear denaturation (nuclear fission and a nuclear nucleolus (apoptotic body)) takes place first, cytoplasm and a cell membrane are ****(ed) by the macrophage. Therefore, a trace does not remain. Since the inflammation residual views on mineralization fibrosis etc. were accepted in the disappearance part of cancer with neither of the cases, as for the example of better SHAKU pharmaceutical preparation administration, disappearance of the cancer by apoptosis was suggested. Moreover, it was clear that cancer has disappeared extremely for a short period of time (one month - 1 month, a half).

[0057] Example 6 Immunological unique sex-test Sarcoma180 tumor cell by the mouse was transplanted back [mouse], and contrast with the control group which nothing has prescribed for the patient about the group which injected intraperitoneally TNP470 (Takeda Chemical Industries, Ltd. make) 10mg, the group which administered better SHAKU 1000 mg/kg orally, and the group which did 24microg intraperitoneal injection of Angie Oster Ching (Institute of Chemical and Serum Treatment make) examined the growth depressor effect of a neoplasm. It turned out that any group has controlled tumor growth with a significant difference ($P < 0.05$) as compared with a control group in the 2nd week and the 3rd week. In the neoplasm tissue of this stage, HSP60, the Fas antigen, and the manifestation of CD80 and CD86 were considered on the immunity histology target. Consequently, HSP60, the Fas antigen, and the manifestation of CD80 and CD86 were increasing intentionally.

[0058] On the other hand, when the same experiment as the above was conducted using the nude mouse which is a T cell deficit mouse, although a certain amount of tumor growth depressor effect was accepted, there was no significant difference. In immunity histological examination of neoplasm tissue, HSP60, the Fas antigen, and the manifestation of CD80 and CD86 were positivities. However, the view of apoptosis was not accepted.

[0059] From the above result, the antitumor action of a neovascularity inhibitor is not based only on the ischemia over a mere neoplasm, the killer T cell has recognized change of a qualitative quantitative manifestation of the manifestation of the stress protein in the ischemia condition of a neoplasm or a Fas antigen, CD80, and CD86 grade, antitumor action was demonstrated, and it was thought that apoptosis was guided.

[0060] Examples 7-10 About the cancer disease Homo sapiens who shows in the example table 5 of concomitant use administration of AHCC and beta SHAKU, while prescribing AHCC for the patient every day by the dosage of 3.0g/day, beta SHAKU was prescribed for the patient every day by internal use by the dosage of 20g/day. After prescribing a medicine for the patient for three months, a therapy judging, NK activity, IL-12 numeric value, and the value of CD4/CD8 were measured. In the example 7 and the example 10, each accepted contraction of 50% or more of neoplasm. However, each NK activity is normal values and it turned out that activity is not accelerating. Also in any of examples 7-10, IL-12 showed the high value far across the normal range. In contraction of a neoplasm, it has guessed that IL-12 were involving. In addition, CD4 expresses a helper T cell among Table 5, and CD8 expresses a killer T cell. The value of CD4/CD8 expresses the degree of increase in quantity of a killer T cell, and with [value] one [or less], it means that the killer T cell is increasing. Normal values are 1.0-1.5.

[0061]

[Table 5]

	ヒ ト	症状	NK活性	血清中IL-12値	治療判定	CD4/CD8値
実施例7	72歳、男性	胃癌 進行癌	24%	240 ng/mL	CR 完全緩解	0.34
実施例8	57歳、男性	盲腸癌 癌性腹膜炎 末期癌	62%	230 ng/mL	CR 完全緩解	0.42
実施例9	69歳、男性	胃癌 肝転移 末期癌	62%	103 ng/mL	CR 完全緩解	0.62
実施例10	71歳、女性	肝癌 肺転移 末期癌	68%	78 ng/mL	PR 転移消失	0.84

[0062]

[Effect of the Invention] the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention — a shark — since the taste with an unpleasant cartilage and a smell are vanished, it is acid resistance and enteric, convenience is in internal use and it combines and has an anticancer operation positive moreover and an analgesic action positive moreover, it is very useful as a physic constituent. Since the concomitant use with the neoplasm neovascularity inhibitor of this invention and interleukin 12 inductor shows very high anticancer activity, it is very useful as a physic constituent.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-147534

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/60	ADU	A 6 1 K 35/60	ADU
	AAH		AAH
35/84	AED	35/84	AEDA
45/00		45/00	

審査請求 有 請求項の数 9 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平8-324595	(71) 出願人	593088108 八木田 旭邦 東京都三鷹市大沢 1-1-21
(22) 出願日	平成8年(1996)11月19日	(71) 出願人	591127917 株式会社セイシン企業 東京都渋谷区千駄ヶ谷 5丁目27番7号
		(71) 出願人	000004341 日本油脂株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
		(72) 発明者	八木田 旭邦 東京都三鷹市大沢一丁目1番21号
		(74) 代理人	弁理士 安富 康男 (外1名)

(54) 【発明の名称】 腫瘍新生血管阻害物質及び医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 腫瘍新生血管阻害物質としてのサメ軟骨を抗癌剤として有効に投与することができる医薬組成物を提供し、更に、このような腫瘍新生血管阻害物質と IL-12 誘導物質とを併用して有用な抗癌作用剤を提供する。

【解決手段】 油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点が異なる他の脂質類で更にコーティングしてなる腫瘍新生血管阻害物質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点が異なる他の脂質類で更にコーティングしてなることを特徴とする腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項2】 微粉末状のサメ軟骨からなる腫瘍新生血管阻害物質であって、前記微粉末状のサメ軟骨は、粒径32 μ m以下のものが99.5重量%以上を占めるものである腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項3】 サメ軟骨が、ヨシキリザメを原料とするものである請求項1又は2記載の腫瘍新生血管阻害物質。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を主成分とすることを特徴とする医薬組成物。

【請求項5】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を主成分とすることを特徴とする抗癌剤。

【請求項6】 請求項1、2又は3記載の腫瘍新生血管阻害物質を、腫瘍新生血管を阻害するのに十分な量投与することを特徴とする癌治療方法。

【請求項7】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項8】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とする抗癌剤。

【請求項9】 腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを併用することを特徴とする癌治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗癌作用及び鎮痛作用に優れた腫瘍新生血管阻害物質、これを含有する医薬組成物及び癌治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】サメ（鮫）は軟骨魚綱に属する魚で、陸部近郊に生息している。サメの骨格は軟骨であり、サメを捕獲、屠殺しその軟骨を取得して製するサメ軟骨は、腫瘍抑制効果を有し、癌治療に有効であることが知られており、例えば、米国産サメ軟骨製品であるカーティレイドは、抗腫瘍物質として市販されている。

【0003】腫瘍は、1～2mm³程度の大きさになると新生血管促進物質を産生し、腫瘍自身の増殖に必要な栄養と酸素とを供給するようになる。この新生血管の増殖を抑制することが腫瘍細胞の肥大化を抑制し癌治療に有効であるところから、新生血管の阻害作用物質についての種々の研究が行われているが、サメ軟骨にこの新生血管を阻害する作用があることが判っている。

【0004】しかしながら、サメ軟骨は、その新生血管阻害のための有効量が1日当たり50～60gと極めて多量であり、味、臭いとも不快であって経口投与が困難な場合が多かった。サメ軟骨はムコ多糖類の混合物であ

って、経口投与による以外に適切な投与方法がなく、経口投与時には強酸性である胃内では溶解せずに吸収部位である腸において溶解する性質を有する必要があった。また、癌患者の多くは衰弱が激しく経口投与が困難である場合が多いので、このような味、臭い、及び、投与量の問題を解決しなければ、サメ軟骨を有効でかつ汎用性の高い抗癌剤として適用することができない状況であった。そこで、サメ軟骨を有効な腫瘍新生血管阻害物質として活用することが強く求められていた。

【0005】ところで、インターロイキン12（IL-12）は、初め、NK細胞の活性作用を有するサイトカインの一つとして発見されたものであるが、その後の研究により、腫瘍細胞に対して特異的な細胞障害活性を有するT細胞（キラーT細胞）の増殖作用及び活性作用を有することが判明し、更には、キラーT細胞の活性化を促す作用を有するインターフェロン γ （IFN γ ）の産生増強作用を有することが認められるに至り、ヒト癌患者の治療に有用な物質として注目されている。

【0006】IL-12については、最近、米国において、遺伝子操作により大量に生産されることに成功した（レコンビナントIL-12（rt-IL-12））。その後、IL-12を、癌細胞に直接投与する目的で、このインターロイキン12産生遺伝子を癌細胞に遺伝子導入手法により、直接導入する方法も試行されている。

【0007】IL-12を活用して腫瘍の増殖喪失又は消失を図るためには、IL-12を外部から投与する方法のほか、生体内に自己のIL-12を誘導せしめる方法がある。このような自己IL-12は、異常な免疫反応が生じるおそれがない等の利点をも有し、感受性の高いものであるので、多大の腫瘍喪失消失効果が期待されるものであった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上記の現状に鑑み、本発明は、腫瘍新生血管阻害物質としてのサメ軟骨を抗癌剤として有効に投与することができる医薬組成物を提供することを目的とするものである。本発明の目的は、更に、このような腫瘍新生血管阻害物質とIL-12誘導物質とを併用して極めて有用な抗癌作用剤を提供することにもある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、油脂マトリックス内に微粉末状のサメ軟骨を包埋させ、前記マトリックス表面を、前記油脂とは融点が異なる他の脂質類で更にコーティングしてなることを特徴とする腫瘍新生血管阻害物質である。以下に本発明を詳述する。

【0010】本発明の腫瘍新生血管阻害物質の主成分であるサメ軟骨は、微粉末状でなければならない。本明細書において、微粉末状とは、その粒径が1～90 μ mであることを意味する。このような微粉末状サメ軟骨を得るためには、例えば、市販のサメ軟骨を微粉末化するこ

とが好ましい。上記微粉末化は、サメ軟骨中の有効成分である蛋白質等が60℃を超えると熱変性して効力を失うことから低温下に行うことが必要である。上記低温下での微粉末化は、例えば、サメ軟骨を-196℃の液体窒素で瞬間冷凍した後、オリエンタミル等のカッター式粉砕機を用いて粗粉碎し、次に、冷凍状態のままインペラールミル等の高速ロータリー型粉砕機で粉碎し、更に、ジェットミル等の気流式粉砕機にかけることにより行うことができる。

【0011】本発明の腫瘍新生血管阻害物質の調製にあたっては、油脂マトリックス内に上記微粉末状サメ軟骨を包埋させる。上記油脂マトリックスを構成する油脂としては、医薬用として通常用いられているものであれば特に限定されず、例えば、大豆油、ナタネ油、パーム油、コーン油、綿実油等の植物硬化油；牛脂、豚脂、魚油等の動物硬化油；これらの混合物等のうちから適宜選択することができる。なかでも、融点が42～56℃の油脂が好ましい。また、場合によっては、ビタミンE、カテキン等の抗酸化剤を併用してもよい。

【0012】上記微粉末状のサメ軟骨を上記油脂をマトリックスとして包埋させる方法としては特に限定されず、例えば、溶解させた上記油脂と微粉末状サメ軟骨とを混合しながら高速攪拌造粒機内において造粒させることにより包埋させることができる。

【0013】上記のようにして製造した微粉末状サメ軟骨包埋油脂マトリックスは、次に、上記油脂とは融点異なる他の脂質類で、その表面を更にコーティングする。本発明の脂質類としては、先に油脂マトリックスを作製するために用いた油脂とは融点異なるもの、通常は融点が高いものを選択すれば良い。具体的には、例えば、カルナバロウ、ライスワックス、ミツロウ等のワックス類、動植物硬化油類、ステアリン酸、パルミチン酸等の脂肪酸類、シェラックのような天然樹脂類、パルミチルアルコール、ステアリルアルコール等の高級アルコール類等を挙げることができる。また、上記コーティングにあたっては、例えば、パウダーコーティング法等の方法を用いることができる。

【0014】本発明の腫瘍新生血管阻害物質を調製するにあたっては、上記のほか、例えば、あらかじめ溶解させた油脂中に上記微粉末状サメ軟骨を分散させて、スプレーコーティングした後、乾動造粒機内で、上記油脂とは融点異なる他の脂質類の微粉末状のものをコーティングする方法等を採用することもできる。

【0015】上記のようにして調製した本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、サメ軟骨を主成分とし、しかも、味と臭いが完全にマスキングされることによって経口投与における困難性を完全に払拭することができる。また、調製された腫瘍新生血管阻害物質の表面における摩擦が低減することにより、流動性が向上しており、付着力が低下して経口投与に極めて適切な製剤とすることが

できる。更に、胃内における強酸性状況では溶解せず、吸収部位である腸において溶解するようにすることができる。

【0016】本発明の微粉末状サメ軟骨は、粒径32μm以下のものが99.5重量%以上を占めるものである。後に実施例で詳述するように、本発明の微粉末状サメ軟骨の粒径は、その効果に極めて大きな影響を有しており、粒径が大きすぎると、腫瘍新生血管阻害作用が低下する。サメ軟骨の粒径を揃える方法としては、微粉末状サメ軟骨を、例えば、所望のメッシュのフルイに通過させる方法等を挙げることができる。

【0017】本発明に用いるサメ軟骨の原料となるサメの種類は限定されないが、特にヨシキリザメから取得されるサメ軟骨が好ましい。ヨシキリザメから取得されるサメ軟骨は、含有されている有効成分である蛋白質、ムコ多糖類が多く、特に良好である。なお、米国産のカーティレイドは、多種類のサメを原料として混合して製造するものであるため、ロットによって製品にバラツキが見られ、その効果も低いことが欠点となっている。

【0018】本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、単に腫瘍新生血管阻害作用を有するばかりではなく、確実な鎮痛作用を有することが判っている。癌患者は、特に末期癌の場合には、激しい疼痛を伴うことが通常である。従って、疼痛を有する癌患者に本発明の腫瘍新生血管阻害物質を抗癌剤として投与した場合、その抗癌作用と鎮痛作用とが相乗効果を現して極めて有効な治療効果を得ることができる。

【0019】本発明の腫瘍新生血管阻害物質が、いかにしてその腫瘍新生血管阻害効果を発現するかについて検討したところ、以下の実施例で詳述するように、apoptosisによるものであることが示唆されている。

【0020】本発明の腫瘍新生血管阻害物質は、抗癌剤として極めて有用であるが、鎮痛効果をも有していることから、他の医薬用途として活用することができるので、本発明の腫瘍新生血管阻害物質を含有する医薬組成物もまた、本発明の一つである。更に、本発明の腫瘍新生血管阻害物質を、その腫瘍新生血管阻害効果を発現することができる量だけ、投与することにより抗癌治療を行う方法もまた、本発明の範囲に含まれるものである。

【0021】本発明の医薬組成物は、腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質とを含有することを特徴とするものである。上記医薬組成物は、第二の本発明を構成するものである。以下に、第二の本発明について詳述する。

【0022】本明細書において、「インターロイキン12誘導物質」という語は、単に生体内にインターロイキン12(IL-12)を誘導しうる物質のみを意味するものではなく、IL-12そのものであっても良いし、IL-12遺伝子導入癌細胞であっても良いし、rIL-12であっても良く、要するに、生体内にIL-

12が生じるものであれば特に限定されるものではない。このようなものとして、例えば、活性化ヘミセルロース (Active Hemi Cellulose Compound (AHCC)) 等を挙げることができる。AHCCは、キノコの菌糸の細胞壁に含まれる植物繊維を酵素処理した生理活性物質として既に公知の物質であり、 β -(1 \rightarrow 3) D-グルカン、 β -(1 \rightarrow 6) D-グルカンのほか、 α -(1 \rightarrow 4) D-グルカン等のヘテログルカン、ペプチドグルカン、プロテオグルカン、レクチン、核酸、不消化性多糖等を含有するものである。

【0023】本発明のIL-12誘導物質は、上記AHCCのほか、キノコ菌糸成分等を挙げることができる。上記キノコ菌糸成分としては特に限定されず、例えば、公知の抗癌剤として使用されているサルノコシカケの菌糸成分であるPSK、スエヒロタケの菌糸成分であるSPG、シイタケの菌糸成分であるレンチナン等を挙げることができる。また、このようなキノコ菌糸成分としては、更に、例えば、アガリクス、霊芝、ニンギョータケ、カワリハラタケ、ニオウシメジ、カベノアナタケ、マイタケ、ヤマブシタケ、ヒラタケ、マンネンタケ、ムキタケ、コブタケ、カイガラタケ、マツタケ、ヒラタケ、ベッコウタケ、ナメタケ、エノキダケ等のキノコ類菌糸成分を挙げることができる。

【0024】本発明のIL-12誘導物質としては、更に、溶連菌の菌体成分等を挙げることができる。このような溶連菌の菌体成分としては特に限定されず、例えば、OK-432等の公知の抗癌剤等を挙げることができる。これらは、生物学的活性化物質 (Biorogical response modifier (BRM)) として、既に公知の物質である。

【0025】上記IL-12誘導物質は、キラーT細胞の活性化を促す作用を有する。従って、上記IL-12誘導物質によって、生体内キラーT細胞が活性化する。一方、上に詳述した腫瘍新生血管阻害物質は、癌細胞 (腫瘍細胞) の新生血管の増殖を抑制する。新生血管の増殖を抑制された腫瘍細胞は、その阻血によるストレスにより腫瘍表面に、Fas抗原、CD80、CD86等の接着因子を発現する。キラーT細胞は、このようなFas抗原、CD80、CD86等の接着因子を抗原認識する能力を有しているので、発現したこれら接着因子はキラーT細胞により容易に認識されうる状態となる。そして、このように容易に認識されるように変化した腫瘍細胞は、キラーT細胞に容易に攻撃されやすくなることとなる。このような状態において、上記IL-12誘導物質が存在すれば、単にIL-12誘導物質のみの作用によるのと比較して格別顕著に腫瘍細胞を攻撃しやすくなる。本発明の腫瘍新生血管阻害物質とIL-12誘導物質との相乗効果は、上記メカニズムに従って行われ、そのことにより、強力な抗癌作用が発現し、そして、a

apoptosisが起こって腫瘍細胞が破壊されてゆくこととなる。このことは、本発明者によって初めて見いだされたものである。

【0026】本発明の医薬組成物をヒト又は動物に投与する場合の形態としては特に限定されず、例えば、担体に担持させて種々の医薬品に用いられる剤型として、適宜適用することができる。このような担体としては、固形、半固形、又は液状の希釈剤、充填剤、及びその他の処方用の助剤一種以上が、例えば、0.1%~99.5%、好ましくは0.5~90%の割合で用いられる。本発明医薬組成物は、経口的又は非経口的に安全に投与することができる。非経口の投与形態として、例えば、組織内投与等の局所投与、皮下投与、筋肉内投与、動・静脈内投与、経直腸投与等が挙げられる。周知慣用の技術手段を用いてこれらの投与方法に適した製剤型を調製すればよい。

【0027】例えば、抗癌剤としての投与量は、患者の年齢、体重、投与経路、疾病の種類や程度等を考慮した上で設定することが望ましいが、ヒトへの投与の場合、通常は、成人に対して有効成分量として、経口的に1~10g/日、好ましくは5~6g/日で投与するのが一般的である。また、非経口的には、投与経路により大きく異なるが、通常、100~10000mg/日、好ましくは2~5g/日の範囲で投与すればよい。場合によっては、これ以下で充分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日2~4回に分割して投与することもできる。

【0028】経口投与は、固形又は液状の用量単位、例えば、末剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、エリキシル剤又は懸濁剤その他の剤型によって行うことができる。

【0029】末剤は、活性物質を適当な細かさにするることにより製造される。散剤は活性物質を適当な細かさとし、ついで同様に細かくした医薬用担体、例えば澱粉、マンニトールのような可食性炭水化物その他賦形剤と混合することにより製造される。必要に応じ矯味剤、保存剤、分散剤、着色剤、香料その他のものを混じてもよい。

【0030】カプセル剤は、まず上述のようにして粉末状にした末剤や散剤又は錠剤を顆粒化したものを、例えばゼラチンカプセルのようなカプセル外皮の中へ充填することにより製造される。また、充填前に滑沢剤や流動化剤、例えばコロイド状のシリカ、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、固形のポリエチレングリコール等を任意に混合しておいてもよい。崩壊剤や可溶化剤、例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシスターチナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等を添加すれば、カプセル剤が摂

取されたときの医薬の有効性を改善することができる。

【0031】また、本品の微粉末を植物油、ポリエチレングリコール、グリセリン、界面活性剤中に懸濁分散し、これをゼラチンシートで包んで軟カプセル剤とすることができる。

【0032】顆粒剤は、粉末状にした活性物質と上述の賦形剤や崩壊剤を混合したものに、必要に応じ結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等）、及び、湿潤剤（例えばシロップ、澱粉糊、アラビアゴム、セルロース溶液又は高分子物質溶液等）を加えて練合し、ついで篩を強制通過させて調製することができる。このように粉末を顆粒化するかわりに、まず打錠機にかけたのち、得られる不完全な形態のスラグを破碎して顆粒にすることもできる。あらかじめ溶解遅延化剤（例えば、パラフィン、ワックス、硬化ヒマシ油等）、再吸収剤（例えば、四級塩等）又は吸着剤（例えばベントナイト、カオリン、リン酸ジカルシウム等）等を混合しておいてもよい。

【0033】錠剤は、このようにして作られる顆粒剤に、滑沢剤としてステアリン酸、ステアリン酸塩、タルク、ミネラルオイルその他を添加し打錠することにより調製することができる。こうして製造した素錠に更にフィルムコーティングや糖衣を施してもよい。

【0034】本発明の活性成分は、上述のように顆粒化やスラグ化の工程を経ることなく、流動性の不活性担体と混合した後直接打錠してもよい。シュラックの密閉被膜からなる透明又は半透明の保護被覆、糖や高分子材料の被覆、及び、ワックスよりなる磨上被覆等も用いることができる。

【0035】他の経口投与剤型、例えばシロップ剤、エリキシル剤及び懸濁剤等もまたその一定量が薬物の一定量を含むように用量単位形態にすることができる。シロップ剤は、活性物質を適当な香味水溶液に溶解して製造され、またエリキシル剤は非毒性のアルコール性担体を用いることにより製造される。懸濁剤は、活性物質を非毒性担体中に分散させることにより処方される。懸濁化剤や乳化剤（例えば、エトキシ化されたイソステアリルアルコール類、ポリオキシエチレンソルビトールエステル類）、保存剤、矯味剤（例えば、ペパミント油、サッカリン）その他もまた任意に添加することができる。

【0036】必要に応じて、経口投与のための用量単位処方方はマイクロカプセル化してもよい。この処方方はまた被覆をしたり、高分子・ワックス等の中に活性物質を埋めこんだりすることにより作用時間の延長や持続放出をもたらしこともできる。

【0037】皮下、筋肉内又は動・静脈内投与は、液状

用量単位形態、例えば溶液や懸濁液の形態の注射剤とすることによって行うことができる。これらのものは、活性物質の一定量を、注射の目的に適合する非毒性の液状担体、例えば水性や油性の溶剤に溶解又は懸濁し、ついでこの溶液又は懸濁液を滅菌することにより製造される。また、粉末又は凍結乾燥した活性物質の一定量をバイアルにとり、その後バイアルとその内容物を滅菌し密閉してもよい。この場合、投与直前に溶解又は混合するために、予備的なバイアルや担体を準備しておいてもよい。注射液を等張にするために非毒性の塩や塩溶液を添加してもよく、さらに安定化剤、保存剤、懸濁化剤及び乳化剤等を併用することもできる。

【0038】経直腸投与剤型は、疎水性又は親水性の坐剤基剤、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級エステル類（例えばバルミチン酸ミリスチルエステル）及びそれらの混合物に活性物質を練合することによって調製することができる。

【0039】

【実施例】以下に本発明の製造例及び実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

製造例1 サメ軟骨の油脂マトリックス被覆製剤の製造
高速攪拌造粒機（ハイスピードミキサー：深江工業社製）に、平均粒径が $27\mu\text{m}$ である微粉状サメ軟骨60重量部を仕込み、機内温度を 10°C に保ち、 $20\sim 100\text{rpm}$ の攪拌をかけながら、溶融した牛脂硬化油（融点 48°C ）10重量部を噴霧した。溶融油脂は、微粉状サメ軟骨を取り込みながらマトリックスを形成したが、この段階では表面にサメ軟骨が露出していて、充分な被覆性能が得られないので、更に、この一次マトリックスの表面に融点の異なる脂質類として、平均粒径 $5\mu\text{m}$ の微粉状ナタネ硬化油（融点 68°C ）30重量部を同一攪拌機造粒機内において攪拌速度約 1000rpm で30分間攪拌し、配位、展着させることにより、耐酸性及び徐放性を有する良好な油脂マトリックス被覆製剤を調製した。

【0040】実施例1 マウスによる腫瘍新生血管抑制作用試験（サメ軟骨粒径の評価）

ドーサル・エア・サック（dorsal air sac）法により試験した。径 5mm のプラスチックリングの両面に、ミリボアフィルターをはり、その中に 1×10^6 個のMH-134腫瘍細胞を培養液とともに注入してチャンバーを作成した。マウスを1群6匹に分け、マウス背部皮下にこのチャンバーを挿入した。4つの群のマウスに、4日間、下記に示すサメ軟骨を $1000\text{mg}/\text{kg}$ 経口投与し、5日めに新生血管の阻害程度を評価した。もう1つの群には、コントロールとしてサメ軟骨を全く投与せずに経過させて5日めに同様に阻害程度を評価した。腫瘍からの新生血管促進物質がミリボアフィルターを透過することによりチャンバーに接した面に新生血

管が増生して観察される。この腫瘍の新生血管はラセン状を呈している。この新生血管の増生の阻害程度を、以下の評価基準に従って評価した。

(++) 3点：新生血管の増生が著明である

(+) 2点：新生血管が増生している

(±) 1点：新生血管がやや増生している

(-) 0点：新生血管の増生が全く認められない

また、抑制率は、コントロール群に対するスコアの減少率(%)で表した。

【0041】サメ軟骨(1)：サメ軟骨の原料として、米国産サメ軟骨製品であるカーティレイドを用い、このものを液体窒素(-196℃)で瞬間冷凍し、カッター*

*式粉碎機(オリエンタミル)で粗粉碎した。次に冷凍状態のまま、高速ローター型粉碎機(インペラールミル)にて粉碎し、最後に気流式粉碎機(ジェットミル)にて更に粉碎して取得し、採用した。

サメ軟骨(2)：上記のサメ軟骨(1)を32μmのフルイにかけて通過しなかったものを採用した。

サメ軟骨(3)：上記のサメ軟骨(1)を32μmのフルイにかけて通過したものを採用した。結果を、表1に示した。

【0042】

【表1】

	++ (3点)	+(2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	4匹	2匹	0匹	0匹	2.7±0.5	--
サメ軟骨(1)	2匹	3匹	1匹	0匹	2.2±0.8	18.5
サメ軟骨(2)	2匹	4匹	0匹	0匹	2.3±0.5	14.8
サメ軟骨(3)	1匹	4匹	1匹	0匹	2.0±0.8	25.9*

*P<0.05

【0043】以上の結果から、サメ軟骨のうちでも、32μmのフルイを通過する程度の粒径を有したサメ軟骨粉碎粉末が新生血管阻害作用が高いことが判った。

【0044】実施例2 マウスによる腫瘍新生血管抑制作用試験(カーティレイドとベターシャークとの比較) 実施例1と同様にドーサル・エア・サック法を用いて米国産サメ軟骨であるカーティレイドとヨシキリザメのサメ軟骨(ベターシャーク)との比較検討をした。結果を表2に示した。カーティレイドでは、100mg/kg投与群で抑制率(コントロール群に対する点数の低下%)は、3.6%であったが、1000mg/kg投与※

※群では、抑制率が、21.4%であり、有意差(P<0.05)が認められた。これに対して、ベターシャークでは、100mg/kg投与群で抑制率が17.9%であり、有意差(P<0.05)が認められ、1000mg/kg投与群で抑制率が35.7%と最も高い値を示し、有意差(P<0.002)が認められた。また、カーティレイドとベターシャークの間でも、有意差が認められた(P<0.05)。

【0045】

【表2】

	投与量 (mg/kg)	++ (3点)	+(2点)	± (1点)	- (0点)	スコア	抑制率 (%)
コントロール	--	9匹	1匹	0匹	0匹	2.8±0.4	--
カーティレイド	1000	3匹	6匹	1匹	0匹	2.2±0.8	21.4*
カーティレイド	100	8匹	4匹	0匹	0匹	2.7±0.5	3.6
ベターシャーク	1000	3匹	2匹	5匹	0匹	1.8±1.0	35.7**
ベターシャーク	100	5匹	4匹	1匹	0匹	2.3±0.8	17.9*

*P<0.05 **P<0.002

【0046】以上の結果から、サメ軟骨のうちでも、カーティレイドよりもベターシャークがより腫瘍新生血管阻害活性が高いことが判った。

【0047】実施例3 マウスによる腫瘍増加抑制試験(ベターシャークの効果発現量測定試験)

腫瘍細胞(Sarcoma-180)の1×10⁶個をICRマウス(雄、6週齢)を1群10匹で3群の背部皮下に移植し、その直後から、カーティレイド(米国産)を1000mg/kgで1日1回連続20日間経口投与した群、ベターシャーク(ただし、粒径を32μm

以下に揃えたものであって、pH2において、3時間静置しても安定であったもの)を同量同期間投与した群、及び、何も投与しないで20日間飼育した群の3群を試験に供して、25日経過後に屠殺して腫瘍重量を計測した。結果を表3に示した。抑制率は、コントロール群に対する重量の減少率(%)で示した。カーティレイド投与群では、コントロール群に対して、11.1%の抑制率であったのに対して、ベターシャーク投与群では、47.0%で有意差(P<0.001)が認められた。またカーティレイドとベターシャークとの比較でも、ベタ

ーシャークの方が、より強い抗腫瘍作用を有することが判った ($P < 0.05$)。

【0048】

【表3】

	平均腫瘍重量 (g)	抑制率 (%)
コントロール	2.752 ± 1.388	—
カーティレイド	2.446 ± 1.139	11.1*
ベターシャーク	1.457 ± 1.965	47.0**

* $P < 0.05$

** $P < 0.001$

【0049】以上の結果から、ベターシャーク（粒径 $3.2 \mu\text{m}$ 以下）を用いた場合には、臨床においては、1日 20 g/body でも充分の有効性が認められるものと推察することができた。

【0050】実施例4 マウスによる鎮痛効果試験

ベターシャークの鎮痛効果を、酢酸ライシング (Writhing) で検討した。ICRマウス（雄、5週齢）*

*を1群10匹で5群に分け、各被検検体を各群に以下のように投与し、40日経過後に、2%酢酸を腹腔内に投与して、酢酸投与後、10日～20日の間にマウスが振り返り反射を起こした回数を計測した。被検検体は、投与後連日計測が終わるまで投与を続けた。カーティレイド投与群は、カーティレイドを1日当たり 1000 mg/kg 経口投与、ベターシャーク投与群は、ベターシャークを1日当たり 1000 mg/kg 経口投与、ベターシャーク投与群は、インダシン投与群は、インダシン（非ステロイド系鎮痛剤。市販品）を1日当たり 25 mg/kg 経口投与、コンドロイチン硫酸投与群は、コンドロイチン硫酸（市販品）を1日当たり 333 mg/kg 経口投与、コントロール群は、何も投与しないで飼育したものであった。抑制率は、コントロール群に対する回数減少率 (%) で表した。結果を、表4に示した。鎮痛効果においても、ベターシャークの優位性が示された。

【0051】

【表4】

	振り返り反射回数	抑制率 (%)
コントロール	31.2 ± 9.6	—
カーティレイド	24.3 ± 3.9	23.6*
ベターシャーク	21.2 ± 10.4	32.1*
インダシン	10.3 ± 5.6	67.0**
コンドロイチン硫酸	23.4 ± 4.5	25.0*

* $P < 0.05$

** $P < 0.001$

【0052】実施例5 ベターシャーク製剤投与の臨床例による免疫学的特異抗原の発現

ヒト（男性、80歳）は上腹部不快感を訴え、胃内視鏡で胃角上部にⅡc進行型の胃癌（印鑑細胞癌）があると診断された。生検材料を電子顕微鏡、組織生検（免疫学的検討）に用いた。心筋梗塞があるため、手術不能であった。実施例1で用いたサメ軟骨（3）（以下、実施例5において「ベターシャーク」という）を、上記の患者に対して、1日 20 g 経口連日投与した。電子顕微鏡所見と免疫学的特殊染色所見（第1回の胃内視鏡）は、ベターシャーク投与前では、通常の癌細胞の一般的所見のみでapoptosisを示す所見は極めて軽度であり、Fas抗原（特殊染色）の接着因子（蛍光抗体法）も認められず、HSP60（ストレス蛋白、heat shock protein 蛍光抗体法）の発現も認められなかった。第1回内視鏡から2カ月半経過した後の胃内視鏡では、癌の周辺は一見正常粘膜で覆われているような所見で、周囲の癌の隆起も平坦になりつつあった。第2回の生検における電子顕微鏡所見は、細胞膜と細胞質に特別の変化が認められないのに対して、癌

細胞の核のくびれ分裂が明らかとなり、apoptotic bodyが認められた。即ち、癌細胞におけるapoptosisを示す陽性所見が認められた。

【0053】この時期の生体組織において免疫学的特殊染色を行った。抗HSP60抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、更には抗Fas抗体を用いて癌細胞を検討した。ベターシャーク製剤投与でFas抗原が陽性となり、更にHSP60及びCD80とCD86の接着因子が陽性となった。第3回（第1回から約5カ月後）の胃内視鏡で胃角上部の癌は完全に消失していた。胃癌があった部位の生検では、いずれも癌細胞は陰性であった。

【0054】以上の所見をまとめると、ベターシャーク製剤投与前に認められていないFas抗原、HSP60抗原、CD80とCD86の接着因子が、ベターシャーク製剤投与後2カ月半でいずれも陽性となった。その後、第3回の胃内視鏡で癌が完全に消失していた。この現象は、ベターシャーク製剤投与により腫瘍の血流が阻害されたため、ストレス蛋白（HSP60）が発現し、Fas抗原、CD80とCD86の接着因子が陽性とな

ったと考えられ、その後第3回の内視鏡で腫瘍が完全縮小していることが証明された。

【0055】腫瘍免疫学の研究から、腫瘍の退縮には、necrosis（壊孔）とapoptosisの2種類があることが判っていた。necrosisは、非特異的免疫が作用して炎症等の要因で腫瘍が消失する現象であり、細胞膜、細胞質ついで核の変性の順で腫瘍細胞が破壊される。このnecrosisの場合は、組織学的には、好中球、マクロファージ、線維芽細胞等が浸潤した後、石灰化、繊維化が起こり癌が消失する。その結果、局所には痕跡が残る。

【0056】一方、apoptosisで腫瘍が消失する場合は、全く炎症は起こらずに痕跡が認められずに正常組織に置き変わっている。この場合は、キラーT細胞が腫瘍細胞の表面のFas抗原を認識して接着し、同時にCD80及び／又はCD86等の接着因子の共同作用でapoptosisを誘導することが判っている。まず核の変性（核の分裂と核小体（apoptotic body））が起こってから細胞質と細胞膜とがマクロファージによって喰食される。従って痕跡が残らない。ベターシャーク製剤投与例は、いずれの症例でも癌の消失部位に石灰化繊維化等の炎症残存所見が認められていないことから、apoptosisによる癌の消失が示唆された。また、極めて短期間（1カ月～1カ月半）で癌が消失していることが明らかであった。

【0057】実施例6 マウスによる免疫学的特異性試験

Sarcoma180腫瘍細胞をマウス背部に移植し、TNP470（武田薬品工業社製）を10mg腹腔内投与した群、ベターシャーク1000mg/kgを経口投与した群、及び、アンジオスタチン（化学及血清療法研究所製）を24μg腹腔内投与した群、について、何も投与していないコントロール群との対比により腫瘍の発育抑制効果を検討した。いずれの群も、コントロール群に比較して2週め及び3週めで有意差（ $P<0.05$ ）をもって腫瘍増殖を抑制していることが判った。この時*

*期の腫瘍組織において、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現が有意に増加していた。

【0058】一方、T細胞欠損マウスであるヌードマウスを用いて上記と同様の実験を行ったところ、ある程度の腫瘍増殖抑制効果を認めたが有意差はなかった。腫瘍組織の免疫組織学的検討では、HSP60、Fas抗原、CD80及びCD86の発現は陽性であった。しかし、apoptosisの所見は認められなかった。

【0059】以上の結果から、新生血管阻害剤の抗腫瘍作用は単なる腫瘍に対する阻血のみによるものではなく、腫瘍の阻血状態におけるストレス蛋白の発現、又は、Fas抗原、CD80、CD86等の質的量的な発現の変化をキラーT細胞が認識して、抗腫瘍作用を発揮し、apoptosisが誘導されたものであると考えられた。

【0060】実施例7～10 AHCCとベターシャークとの併用投与例

表5に示す癌罹患ヒトについて、AHCCを3.0g/日の用量で連日投与すると同時に、ベターシャークを20g/日の用量で経口投与により連日投与した。3カ月投与した後、治療判定とNK活性、IL-12数値及びCD4/CD8の値を測定した。実施例7及び実施例10においては、いずれも50%以上の腫瘍の縮小を認めた。しかし、NK活性は、いずれも正常値であり活性が亢進していないことが判った。実施例7～10のいずれにおいても、IL-12値は、正常範囲をはるかに超えて高い値を示した。腫瘍の縮小には、IL-12が関与していることが推察できた。なお、表5中、CD4は、ヘルパーT細胞、CD8は、キラーT細胞を表す。CD4/CD8の値は、キラーT細胞の増量の度合いを表し、1以下であれば、キラーT細胞が増量していることを表す。正常値は、1.0～1.5である。

【0061】

【表5】

	ヒト	症状	NK活性	血清中IL-12値	治療判定	CD4/CD8値
実施例7	72歳、男性	胃癌 進行癌	24%	240ng/mL	CR 完全縮小	0.34
実施例8	57歳、男性	盲腸癌 癌性腹膜炎 末期癌	62%	230ng/mL	CR 完全縮小	0.42
実施例9	69歳、男性	胃癌 肝転移 末期癌	62%	103ng/mL	CR 完全縮小	0.62
実施例10	71歳、女性	肺癌 肺転移 末期癌	68%	78ng/mL	PR 転移消失	0.84

軟骨の不快な味、臭いを消失させ、耐酸性かつ腸溶性であり経口投与に利便性があり、そのうえ確実な抗癌作用と鎮痛作用とを併せ有するので医薬組成物として極めて

有用である。本発明の腫瘍新生血管阻害物質とインターロイキン12誘導物質との併用は、極めて高い抗癌活性を示すので、医薬組成物として極めて有用である。